

Universitetet i Oslo
Det odontologiske Fakultet
Institutt for Oral Biologi

Masteroppgave

p75 neurotrofinreseptor (p75^{NTR}) i normalt vev og munnhulekreft.



Av student odont: Åshild Kvammen

Veiledere:
Professor Magne Bryne
Spesialistutdanningskandidat, PhD Tine M. Sølund
Stipendiat Ingvild J. Brusevold



Bildet er hentet fra: <http://www.chanceglass.co.uk/dev/microscop>

Innholdsfortegnelse:

Introduksjon	s 3-7
Generelt om kreft	
Kreft i munnhulen	
Tannlegens rolle i sammenheng med kreft i munnhulen	
Generelt om forskning innen kreft	
Mål med studien	s 6
Materiale	s 7
Normal oral slimhinne	
Orale plateepitelkarsinomer	
Tredimensjonal organotypisk munnhulekreftmodell	
Metode	s 8
Immunhistokjemi	
Uttesting av antistoff	
Farging av normal slimhinne, orale plateepitelkarsinom og tredimensjonal organotypisk munnhulekreftmodell	
Resultater	s 12
Normal oral slimhinne	
Orale plateepitelkarsinomer	
Tredimensjonal organotypisk munnhulekreftmodell	
Oppsummering og konklusjon	s 14
Diskusjon av metode og forklaring av prosedyrer	s 15

Generelt om kreft

Kroppen vår er satt sammen av celler som danner vev og organer. Celler har begrenset levetid, ulik etter hvilken type celle og beliggenhet. For at kroppen vår skal fungere, er vi hele tiden avhengig av at vi får nye celler og at gamle celler dør. Dette er ved friske forhold hele tiden i balanse, slik at antall nye celler er lik antall celler som dør. Kreft er en gruppe sykdommer som er karakterisert av ukontrollert vekst og differensiering av celler. Kreften stammer fra en initiator-celle som har fått nye egenskaper, evnen til å dele seg og vokse unormalt/ukontrollert. Det skjer fordi DNA i cellen er blitt endret, mutert, i områder som har med kontroll av vekst og deling av cellen. Disse endringene kan skje spontant eller som resultat av en skadelig påvirkning, et mutagen. Et mutagen er en påvirkning som har evnen til å endre DNA og samtidig øker muligheten for flere mutasjoner. Et mutagen er ofte også et karsinogen. Et karsinogen er en skadelig påvirkning som kan være årsaksfaktor til kreftutvikling. Når en celle har fått en DNA skade, vil den ofte oppdages av kroppen, som enten reparerer, eller eliminerer cellen. Dersom skaden ikke oppdages av kroppen, vil deling av cellen til nye datterceller sette i gang en prosess som i noen tilfeller vil kunne gi en benign vekst, en premalign- eller malign endring. Det dannes en celleklump, en svulst. Det finnes mange ulike typer svulster. De er forskjellige i forhold til hvilke cellelinjer og vev de stammer fra, og har ulik aggressivitet. Kreft klassifiseres etter et eget system. Vi har benigne, godartede svulster og maligne, ondartede svulster. Godartede svulster består av celler som vokser og deler seg. Ekspansjonen kan føre til at cellene utøver et trykk på omkringliggende vev, som noen ganger kan resultere i fortrenging av omkringliggende vev, men benigne svulster har ikke evnen til å vokse inn i, eller spre seg videre til andre vev. Ondartede svulster derimot, har evnen til å vokse inn i nærliggende vev og infiltrere disse. Ondartede svulster kan også spres til andre, mer fjerntliggende vev. Det skjer ved at enkeltceller fra den opprinnelige, primære svulsten kommer over i blodårer eller lymfe. De kan da fraktes med strømmen til de kommer et sted hvor de kan komme ut av karveggen, slå seg ned og danne nye svulster på den nye lokalisasjonen. Denne prosessen kalles å metastasere, og dattersvulsten er en metastase. Kreft kan gjøre alvorlig skade på vev og organer og er en livstruende sykdom hvis den ikke behandles.

På verdensbasis er det mer enn 10 millioner nye tilfeller av kreft hvert år og 6 millioner dødsfall som følge av kreft. Mer enn 20 millioner lever med en kreftdiagnose (1). Man ser at antall tilfeller øker, dette på grunn av økt levealder samt høye eller økende mengder risikofaktorer for kreft. Sosioøkonomiske faktorer har en sammenheng med antall nye tilfeller samt overlevelse av kreftsykdommen. Forskning viser at de med lavere sosioøkonomisk status er mer utsatt for å utvikle kreft, blant annet fordi de har mindre tilgang på helsetjenester, som igjen fører til dårligere prognose (1).

Kreft i munnhulen

I Norge er vi heldige som har god tilgang til helsetjenester. Kreftregisteret har publisert data som viser at det i Norge i pr 31.12.2007 var 183 252 personer som levde med en kreftdiagnose (www.kreftregisteret.no). 3467 av disse hadde kreft i munn eller svelg. Incidensen, antall nye tilfeller av kreft i munnhule eller svelg i 2007, var 444, 281 av disse var menn og 163 kvinner (www.kreftregisteret.no). Sett på verdensbasis, er kreft i munnhule og svelg de 11. mest vanlige kreftformene, men forskjellene kan være store fra land til land. Det er flest menn som utvikler denne typen kreft, og det er mer vanlig i utviklingsland enn i industrialiserte land. Spesielt i Sørøst Asia og enkelte Afrikanske land, er forekomsten av denne typen kreft høyere enn i andre land, både for menn og kvinner. Risikofaktorer for utvikling av kreft i munn og/eller svelg er mange. De to sterkeste risikofaktorene er alkohol og tobakk. Til sammen er de årsak til $\frac{3}{4}$ av all oro-pharyngeal kreft i USA. Det er også vist at tobakksbruk sammen med alkohol, virker synergistisk, de forsterker hverandre. Effekten er sterkere jo mer man forbruker. Overforbruk av alkohol er assosiert med feil/underernæring (1). Det er vist en sammenheng mellom feilernæring og utvikling av kreft i munnhulen. I Sørøst Asia og Stillehavsyene er det relativt vanlig å tygge betelblader. De har også en frukt/nøtt som kalles Areca. Denne deles i fire og hver bit pakkes inn i betelblader. Noen ganger tilsettes tobakk. Dette tygges og gir en rus, en euforisk følelse og øket årvåkenhet (2). Betelbladene og arecanøtten er hver for seg karsinogene (3). Det er også vist sammenheng mellom kreft i munnhulen og oral HPV (humant papillom virus) (4).

Tannlegens rolle i sammenheng med kreft i munnhulen:

Forebygging, tidlig oppdagelse, behandling og palliativ (lindrende) behandling er nøkkelbegreper når det kommer til kreft. Det er nå så mye kunnskap om hvordan man kan forebygge kreft at det kunne forhindre så mye som en tredjedel av all kreft på verdensbasis (1). Kreft i munnhulen kan forebygges ved å eliminere risikofaktorer. Tannlegen kan derfor oppfordre alle pasienter til en sunn livsstil. Tannlegen skal også bruke sine kunnskaper om anatomi og patologi i en grundig klinisk undersøkelse og vurdering av hver enkelt pasient. Kunnskap om mulige premaligne tilstander skal noteres og følges opp og pasienten skal få den riktige og nødvendige informasjon om sin egen helse. Eksempler på premaligne tilstander er erytroplaki, leukoplaki, submukøs fibrose med flere (4)

Det er viktig å reagere raskt dersom man mistenker kreft. Noen generelle varseltegn er følgende lesjoner som varer over 2-3 uker (4).

- hvite eller røde lesjoner
- blandede røde og hvite lesjoner
- "klump" /svulst
- sår med fissurering eller eksofyttisk vekst
- smerte og ømhet

- løs tann
- ekstraksjonsalveole som ikke gror

Selv om man finner disse tegnene, er det ikke nødvendigvis kreft. Men dersom tannlegen er mistenker dette, kan han/hun enten selv utføre en biopsi eller henvise pasienten til en spesialist i oral medisin for videre utredning. En biopsi kan for eksempel tas som et båtformet utsnitt fra det mest irregulære området av lesjonen, legges i formalin for fiksering, og sendes til histopatologisk undersøkelse hos oralpatolog. Det er også mulig å henvise pasienten til fastlegen for utredning. Det viktigste er at man ikke "slipper" pasienten, og at man kun tillater en kort observasjonsperiode før man tar grep. Dersom det skulle være kreft, kan man skade pasienten ved en "doctors delay". Dersom en tannlege får et positivt prøvesvar fra en patolog eller oralmedisiner om at det er en svulst, skal alltid epikrisen sendes til pasientens fastlege. Det er fastlegen som har helhetsinformasjonen om pasientens helse, og dermed er den som best kan legge forholdene til rette for og har ansvaret for behandlingen videre.

Generelt om forskning innen kreft

På verdensbasis legges det ned store ressurser for å løse alle aspekter ved kreftgåten. Til tross for mye forskning består behandlingen av hode- halskreft fremdeles av kirurgi og stråling. Kjemoterapeutika gis som palliativ behandling, og gir ikke økt levetid. Selv med all denne forskningen, ser man dessverre liten endring i antall overlevende. Dessverre er det slik at orale plateepitelkarsinomer i over 50 % av tilfellene er dødelige i løpet av 5 år. Dette fordi de gjerne oppdages i sene stadier (5). Det å oppdage svulstene tidligere må derfor være et mål. Noen av metodene som finnes i dag er farging av vitalt vev, optiske teknikker, cytologi, DNA undersøkelse, ulike molekulære markører og salivære biomarkører. Enda er ingen av disse diagnostiske hjelpemidlene akseptert som bedre enn en god klinisk undersøkelse med påfølgende histopatologisk undersøkelse (4).

Immunohistokjemi har vært brukt til å oppdage molekulære endringer i tumorvev og har et potensial til å oppdage endringer som kan være av prognostisk verdi. En prognostisk faktor kan for eksempel være et protein som er signifikant høyere uttrykt i kreftceller med høyere malignitetspotensial. På denne måten kan man identifisere hvor aggressiv en tumor er. Ved bruk av prognostiske markører, vil man kunne få informasjon som kan brukes for å si pasienten noe om hvilken om prognose den har, og videre selektare individuell behandling for hver enkelt pasient. Enten ved bruk av konvensjonelle terapiformer, eller utvikle nye, mer spesifikke terapeutika som går direkte inn på molekulære faktorer i de endrede cellene. Et eksempel på en mulig prognostisk faktor er p75^{NTR}.

p75^{NTR} er en glykoprotein, transmembran vekstfaktor reseptor som først ble beskrevet i nervevev. I de senere år har man funnet at p75^{NTR} også finnes i en del andre vev, blant annet i epitelceller i munnslimhinnen og i munnhulekreft. p75^{NTR} er beskrevet i cellemembranen og i cytoplasma. Studier viser at reseptoren kan indusere cellevekst (proliferasjon) i noen situasjoner, mens den i andre situasjoner kan indusere celledød (apoptose). Flere faktorer påvirker hvordan virkningen av p75^{NTR} er i de ulike vevene. Dette kan variere med om p75^{NTR} binder en ligand, og hvilken ligand den binder, om den fungerer "alene" eller i kompleks med andre membranreseptorer.

Tine M Sølund i vår gruppe, har nylig vist at forekomst av p75^{NTR} i cellemembran og cytoplasma av orale plateepitelkarsinomer indikerer tilbakefall av svulstene, og dermed kan fungere som en prognostisk faktor (6).

Nå viser det seg overraskende, at p75^{NTR} også kan finnes i kjernen av epitelceller (keratinocytter) i munnhulen. Vi vet ikke om hele reseptoren forflyttes inn til kjernen, eller om det er en del av reseptoren, som fraktes inn til kjernen. Verken forflytting av hele, eller deler av transmembranfraktoren (translokasjon) fra membran til kjerne, eller funksjon av reseptoren ved denne lokalisasjonen er, så langt vi er kjent med, studert i oralt vev. Vårt antistoff binder seg til en epitop (et festested som er unikt for reseptoren) på p75^{NTR} sin intracellulære del. Antistoffet er produsert for å gi kjernefarging. Funksjon av kjernelokalisert p75^{NTR} er helt ukjent, men det er kjent at enkelte reseptor-tyrosin kinaser som er påvist i kjernen kan være involvert i transkripsjonskontroll.

Verken forflytting av hele, eller deler av denne reseptoren (translokasjon) fra membran til kjerne, eller funksjon av reseptoren ved denne lokalisasjonen er, så langt vi er kjent med, studert i oralt vev.

Hensikten med studien er:

- 1) Å lære metoden immunohistokjemi
- 2) Teste ut et nytt p75^{NTR} antistoff som skal farge p75^{NTR} i kjernen av oralt plateepitel.
- 3) Undersøke forekomst av p75^{NTR} i kjerne i normal oral slimhinne, i orale plateepitelkarsinomer og i en 3D-co kultur organotypisk munnhulekreftmodell.

Materiale

Materialet vi har undersøkt er:

1) Normal oral slimhinne

Dette er biopsien som kommer fra ekstirpasjoner av visdomstenner og andre oralkirurgiske inngrep, innhentet med tillatelse fra regional komité for medisinsk forskningsetikk (REK sør Norge). Det er normal slimhinne hentet fra friske personer som har gitt informert samtykke. Preparatene er fiksert i formalin og innstøpt i parafin, så lagret kjølig.

2) Biopsier fra orale plateepitelkarsinomer

Tumorvevet er også innhentet med tillatelse fra REK, sør Norge. Vi brukte i denne studien 6 snitt fra tilfeldig valgte pasienter med primær T1-T2N0M0 orale plateepitelkarsinom. Diagnosen var allerede bekreftet av oralpatolog H.S.Koppang. Disse svulstene er mindre eller lik 4 cm i diameter, har ingen kjent spredning til lymfeknutene og har heller ikke metastasert. Det er altså tidlig oppdagede, relativt små svulster. De er fiksert i formalin og innstøpt i parafin, så lagret kjølig.

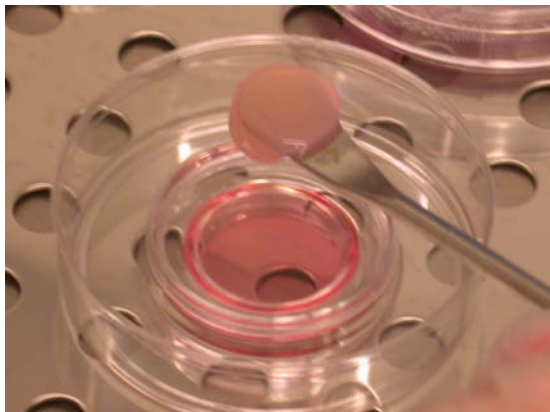
3) 3-dimensjonal organotypisk munnhulekreftmodell.

Cellene vi har farget og sett etter immunohistokjemiske markører i, kommer fra en 3-D co-kultur organotypisk munnhulekreftmodell. (Foto: Ingvild J Brusevold)

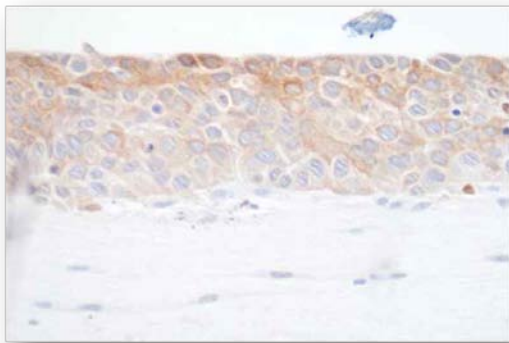
Modellene er laget ved at orale plateepitelkarsinomceller dyrkes på toppen av en matriks med fibroblaster.

Vi har to typer modeller: En med lite

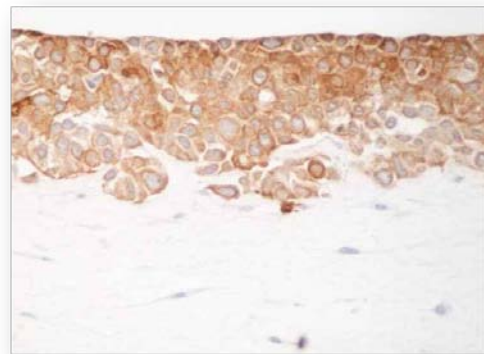
invasjon og en med mye invasjon (Figur 1 og 2). Bildene viser keratinfarging av kreftmodellen (Foto: Ingvild J Brusevold). Ved endte 11 dager, høstes modellene. Da tar man dem ut av varmeskapet, fikserer dem i paraformaldehyd, støper dem i voks og oppbevarer dem kjølig.



Figur 1: Lite invasjon



Figur 2: mye invasjon



Vi har studert om modellene som viser mye invasjon har endret ekspresjon av kjerne $p75^{NTR}$, i forhold til de med lite invasjon.

Metode:

Immunohistokjemi er en fin metode til å påvise og lokalisere biologiske strukturer, gjerne et protein i vev. For eksempel i matrix, cellemembran, cytoplasma eller kjerne. Man vet som regel nok om det proteinet man ønsker å detektere, slik at man kan fremstille eller bestille et kommersielt tilgjengelig antistoff som kan binde til ønsket struktur/protein (antigen).

Antistoffer er stoffer alle mennesker har i kroppen. De er en del av immunforsvaret vårt og har evnen til å binde helt spesifikt, som hånd i hanske, til kroppsfrømmede antigener. Kroppen vår kan på den måten eliminere sykdomsfremkallende stoffer/antigener. Det er denne "hånd i hanske" funksjonen, den spesifikke bindingen, man utnytter ved immunohistokjemisk metode. Man fremstiller ønskede antistoffer som er rettet spesifikt mot gitte antigener. Antistoffene kan være monoklonale eller polyklonale. De monoklonale antistoffene er fremstilt av bare en plasmacelleklon og kan bare binde seg til en epitop på antigenet. De fleste monoklonale antistoffene er fremstilt i et forsøksdyr, eksempelvis mus. Antigenet sprøytes inn i forsøksdyret. Dyret får en immunologisk respons på dette, og B-celler som produserer antistoffer mot antigenet, hentes ut fra milt. B-cellen fusjoneres med en kreftcelle og man kaller det nå et hybridom, en kunstig antistoffproduserende celle. Hybridomet gir ubegrenset tilgang til antistoffet. Produksjon av polyklonale antistoffer foregår ved at antigenet introduseres for et forsøksdyr (kanin, hest, geit med fler). Dyret får en immunologisk respons, og man henter ut flere plasmacellekloner som produserer ulike antistoffer rettet mot flere epitoper på det samme antigenet.

Snitting

For at man i det hele tatt skal kunne se cellene i et lysmikroskop, må man skjære preparatet opp i tynne, tynne skiver og plassere dem på et objektivglass.

Denne snittingen gjøres på en spesiell maskin som lager 4µm tykke skiver. De voksstøpte blokkene hentes fra kjølerom og fryses ned for at de skal bli lettere å få fine, tynne snitt. De hentes en og en fra fryseren. Maskinen stilles inn med riktige horisontale vinkler, vertikale vinkler og dybde. Dette er viktig for å hindre at man tar skjeve snitt, ikke at man får med seg så mye som mulig av preparatet i hvert snitt, men samtidig ikke bruker det opp raskere enn nødvendig. Jo flere snitt man får ut av hver biopsi eller modell, jo bedre. Det er viktig at knivens egg er helt skarp og ikke har støvkorn eller ujevnheter i seg. Bare små, ujevnheter gir rifter i snittene, og gjør at de ikke kan brukes.

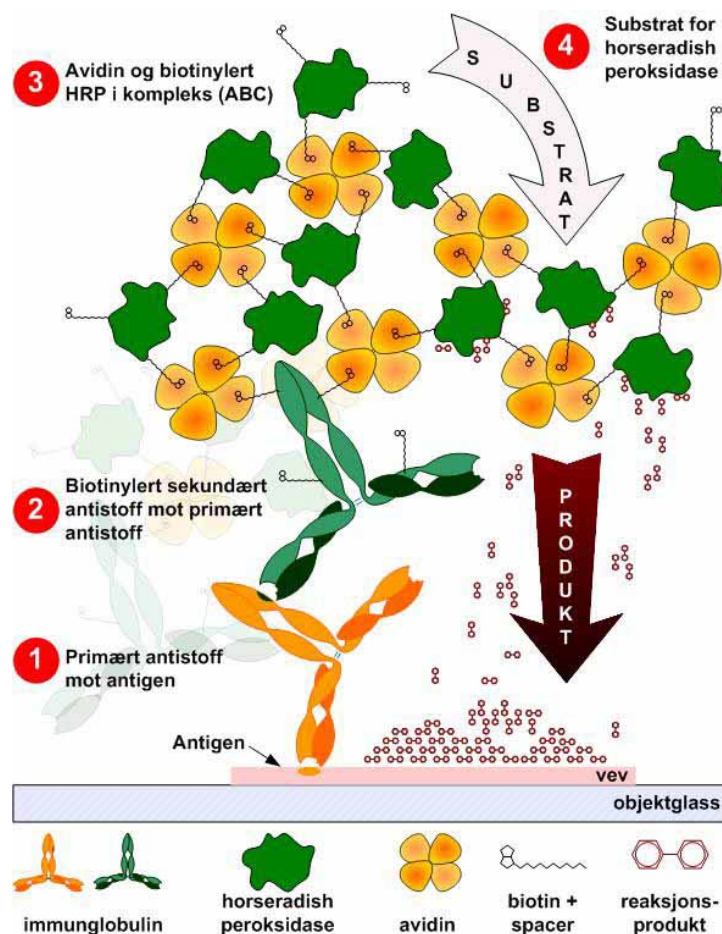
Etter snittingen føres de tynne celledsnittene, som fremdeles er innstøpt i voks, over i et 39° C varmt vannbad. Da retter de seg ut og er lette å føre over på et positivt ladet objektivglass. Objektivglassene er ferdig merket med nummer og identifisering av vevsbiten som er på. Dette gjøres i en egen maskin.

Når vevsbitene er festet på glasset, settes alle de ferdige snittene i et varmeskap som holder 60° C i ca 2 timer. Voksen vil da smelte av og lime snittene til objektivglasset. Snittene er nå klare til bruk. De oppbevares kjølig, i lukkede bokser, til de skal brukes.

Uttesting av antistoff IHC-P Anti NGFR kanin, kjernefarging av P75^{NTR}:

Før man kan farge alt vevet man ønsker å studere forekomsten av et molekyl i, er det viktig å sikre seg at man bruker den mest optimale metoden til det gitte vev. Antistoffet kommer alltid med en anbefalt bruksanvisning, men man kan ikke ta for gitt at denne da oppgitte konsentrasjonen og fremgangsmåten alltid er den beste. Vi utførte derfor en variasjon av behandlinger for å komme fram til hvilken som farger mest riktig. I uttestingen brukte vi den organotypiske munnhulekreftmodellen.

Figur 3 viser en skisse som kan følges for å forstå metoden som beskrevet nedenfor. Se også diskusjonen:



Figur 3: Hentet fra <http://www.iob.uio.no/forskning/celler/teknikk/IH.html>

Metode ved uttesting

Behandling	Virketid	
Forbehandling:	Deparaffinert og hydrert	
Quenching:	3 % vannstoffperoksid i metanol	30 minutter
Forbehandling:	PIER- proteinase K 20 µg/ml	
	- Pepsin 8 µg/ml	
	HIER- NatriumCitratbuffer pH6	
	- EDTA pH8	
	- CCA pH 7,5	
Normalserum:	Normal geit	30 minutter

(Følg nå punktene i figur 3)

1)Primært antistoff: Kanin, polyklonalt, monospesifikt Anti-NGFR 1:500 over natt i kjøleskap

2)Biotinylert sekundært antistoff: geit α (anti) kanin 30 minutter

3)ABC: ABC^{hrp} 60 minutter

4)Substrat: DAB 7 minutter

Kontrastfarging: Hematoksylin 5 sekunder

Etterbehandling: Dehydrert til Xylen og montert med Histokit

Kontroller:

Positive kontroller: HIER; CCA

Uten forbehandling

Negative kontroller: HIER; CCA

Disse ble ikke tilsatt spesifikt antistoff, uspesifikk IgG eller fysiologisk saltvann; PBS

Etter å ha sett alle snittene, med de ulike behandlingene besluttet vi å gå videre med antistoffkonsentrasjon 1:500 og HIER forbehandling med Citratbuffer. Dette er også den behandlingen produsenten av antistoffet anbefalte.

Metode ved farging av modeller, svulster og normal slimhinne

Behandling	Virketid
Forbehandling:	Deparaffinert og hydrert
Quenching:	3 % vannstoffperoksid i metanol 30 minutter
Forbehandling:	HIER, Citratbuffer
Normalserum:	Normal geit 30 minutter

(følg nå punktene i figur 3)

1)Primært antistoff: Kanin, polyklonalt, monospesifikt Anti-NGFR 1:500 over natt i kjøleskap

2)Biotinylert sekundært antistoff:	geit α kanin	30 minutter
3)ABC:	ABC ^{hrp}	60 minutter
4)Substrat:	DAB	7 minutter
Kontrastfarging:	Hematoksylin	5 sekunder
Etterbehandling:	Dehydrert til Xylen og montert med Histokit	

Resultat av farginger:

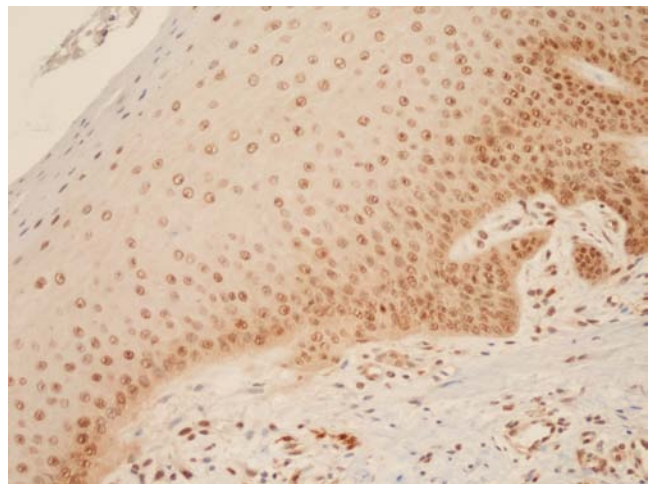
1) Resultat av farginger av normal oral slimhinne

p75^{NTR}-farging kan sees i cellekjerner på bildet som brunt.

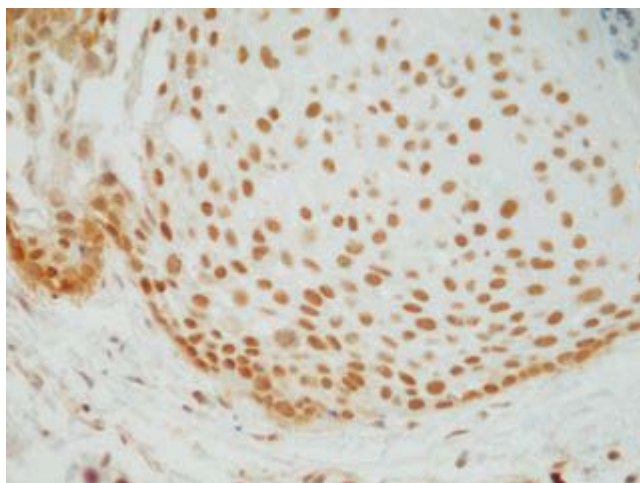
p75^{NTR} er høyt uttrykt i kjerner, samt cytoplasmatisk i basalcellelaget. Noen steder kan man se membranfarge.

Konklusjon: p75^{NTR} er til stede i kjernen av normal slimhinne.

(Foto: Normal oral slimhinne, tatt av Åshild Kvammen, IOB)



2) Resultat av farginger av biopsier fra orale svulster



(Foto: oralt plateepitelkarsinom, tatt av Ingvild J. Brusevold, IOB).

Den første gangen vi gjorde farging av svulster, hadde vi snitt som hadde stått ferdig snittet ganske lenge, og vi vurderte at dette kunne være årsaken til at vi ikke fikk så god farging. Derfor besluttet vi å gjøre en ny farging.

Andre gangen, var snittene vi brukte nysnittede samme dag. Dette ga godt resultat.

I plateepitelkarsinomene så vi varierende grad av farging på de ulike svulstene. Noen steder var det flere positive kjerner, andre steder mindre. Vi fant positivt nervevev i de orale svulstene som viser at antistoffet binder til p75^{NTR} (henviser til senere forklaring av positiv kontroll). Vi så en mulig tendens til at kjernene var negative i høyt differensierte områder, og at de var positive i de lavt differensierte, mest invasive områdene. Cytoplasma var positivt i basale lag. Fordi vi farget på så få svulster, kan vi ikke trekke en sikker konklusjon ut av disse observasjonene.

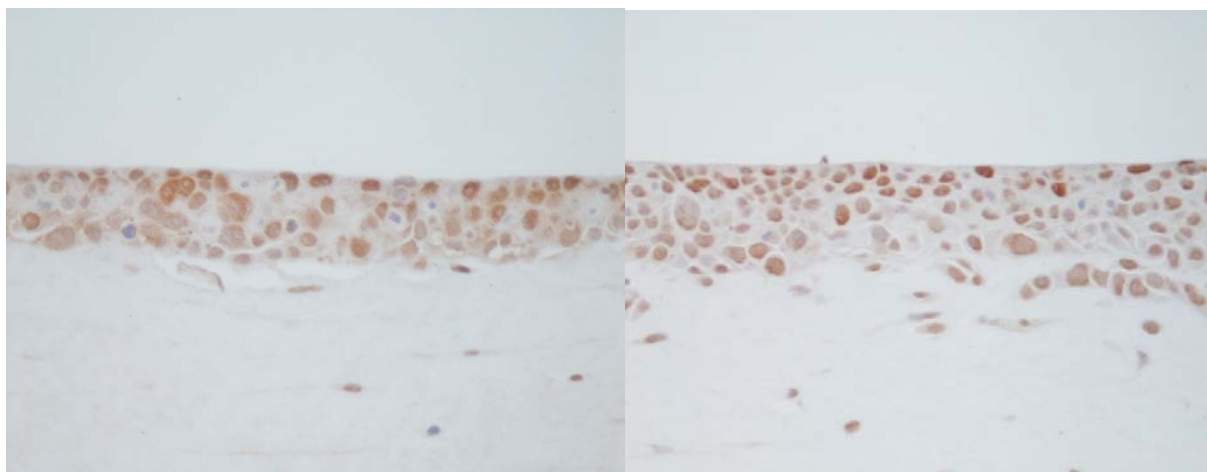
Konklusjon:

- Det er nukleært p75^{NTR} i plateepitelkarsinomene.
- Dette får vi ikke fram dersom snittene er "gamle". Snittene må altså snittes samme dag.

3)Resultater av farginger av 3-dimensjonal organotypisk munnhulekreftmodell

Modell som viser lite invasjon

Modell som viser mye invasjon



p75^{NTR}-farging. Det er liten forskjell i antall positive kjerner på de to modellene.

Modellene viste både positive og negative kjerner. Vi talte antall positive og negative kjerner ved at vi tok bilder av alle modellene. På hvert bilde ble antall positive og antall negative kjerner manuelt registrert ved hjelp av et dataprogram. Brune cellekjerner ble scoret som p75^{NTR}-positive, de blå cellekjernene ble scoret som p75^{NTR}-negative. Snittene ble nummerert vilkårlig, og tellingen foregikk uten at telleren kunne vite om det var snitt med mye invasjon eller lite invasjon, med andre ord: tellingen foregikk blindt.

Statistikk:

Etter at all tellingen av p75^{NTR} positive -og negative cellekjerne var ferdig, ble dataene brukt i et statistisk dataprogram. Programmet hjelper til med å tolke datamengden og sier om det er noen forskjell mellom de manipulerede cellene og de cellene som ikke er manipulert (SPSS 16.0).

Vi gjorde en sammenligning av to grupper. Vi lagde en nullhypotese som sa: gruppene er like hverandre.

Hypotesen vi testet var:

H₀: p75^{NTR} i modeller med lite invasjon = p75^{NTR} i modeller med mye invasjon.

Dataprogrammet vurderte så de to gruppene opp mot hverandre og så om forskjellene mellom de to gruppene var resultater av normal variasjon, eller om det var signifikante forskjeller mellom gruppene som ikke kunne skyldes tilfeldigheter. Signifikansnivå ble satt til 5 %. Signifikansnivå angir den risiko vi er villige til å akseptere i forhold til å få feil resultat. Vi godtar at det er 5 % sjanse for at funnene er tilfeldige. Det gjeldende er at dersom man etter sammenligning av gruppene kommer fram til at man forkaster nullhypotesen, har man et signifikant funn (7).

Vårt datagrunnlag var ikke helt normalfordelt, vi utførte derfor en Mann Whitney-test.

Mann Whitney-testen er en ikke-parametrisk test som sammenligner to grupper som ikke er normalfordelt, ved hjelp av medianen i hver gruppe.

Resultatene ble analysert og vi kom frem til at det ikke var noen signifikant forskjell på antall p75^{NTR} positive kjerner mellom modeller som viste lite invasjon og de som viste mye invasjon. **Vi kan dermed antyde at kjernelokalisert p75^{NTR} ikke er relatert til invasjon av karsinomceller i en modell.**

Resultat, oppsummering og konklusjon fra alle fargingene:

Vi har i våre forsøk vist at p75^{NTR} er tilstede i kjernen av epitelceller (keratinocytter) i munnhulen. Vi finner det også uttrykt i karsinomceller i orale plateepitelkarsinomer og vi har funnet det i kreftmodellen.

Vi kan ikke si noe om hvilken funksjon p75^{NTR} har i kjernen, men vi har vist at den/deler av den er der. Angående antistoffet vårt har jeg ringt produsenten og fått vite det at binder til det intracellulære domenet av p75^{NTR}. Dette innebærer at vi har påvist at den intracellulære delen av p75^{NTR}-molekylet som vårt antistoff har bundet seg til, og via en cellulær mekanisme, forflyttes (translokeres) inn i kjernen fra sin opprinnelige lokalisasjon i cellemembranen eller cytoplasma. Vi kan ikke si om det er hele reseptoren som fraktes inn

via en prosess som kalles endocytose, eller bare deler av den som spaltes av og som translokteres inn i kjernen.

Vi vet at p75^{NTR} ved andre lokalisasjoner som i cytoplasma og i cellemembran er høyere uttrykt i de mer aggressive kreftsvulstene (6). Vi kan ikke se at dette også gjelder for kjernelokalisert p75^{NTR}. Vi kan dermed si at det er et negativt funn.

Diskusjon av metoden immunohistokjemi og dypere forklaring av gangen i prosedyrer:

Vurdering av fargemetodene i uttestingen og ved farging av materialet

I vurderingen måtte vi undersøke om antistoffet hadde bundet seg til riktig antigen. Det kan man undersøke ved hjelp av kontroller. Det finnes positive og negative kontroller.

Vi ønsker en positiv, positiv kontroll. Det betyr at vi påviser antigenet vi undersøker i celler som vi vet har det. I materialet vårt fant vi at nervevevet lot seg farge. Dette kunne vi bruke som positiv kontroll, da vi vet at p75^{NTR} er reseptor for nerve growth faktor. Vekstfaktoren har fått dette navnet fordi den først ble påvist i nervevev.

Vi hadde også negative kontroller hver gang vi gjorde farginger. I negative kontroller tilsettes ikke antistoffet mot vårt antigen. De tilsettes derimot uspesifikke antistoffer i form av IgG eller bare fysiologisk saltvann, PBS, istedenfor det primære antistoff. Kontrollene skal derfor ikke gi positiv farge. IgG kan binde uspesifikt i de cellene vi farger. Dersom IgG kontrollen gir farge, vet vi at vi har en feilkilde. Det samme gjelder PBS, fysiologisk saltvann. Dersom man får farge i PBS-kontrollen, vet man at det sekundære antistoffet binder seg til vevet, og derfor gir farge. Er den negative kontrollen positiv, kan vi ikke stole på det vi ser i mikroskopet. Et eksempel på årsak til positiv negativ kontroll, kan være at endogent biotin i vevet feller ut og gir bakgrunnsfarge. Det problemet hadde vi heldigvis ikke, men det finnes teknikker for å blokkere endogent biotin dersom det skulle være et problem.

Arbeidsgangen ved immunohistokjemisk farging.

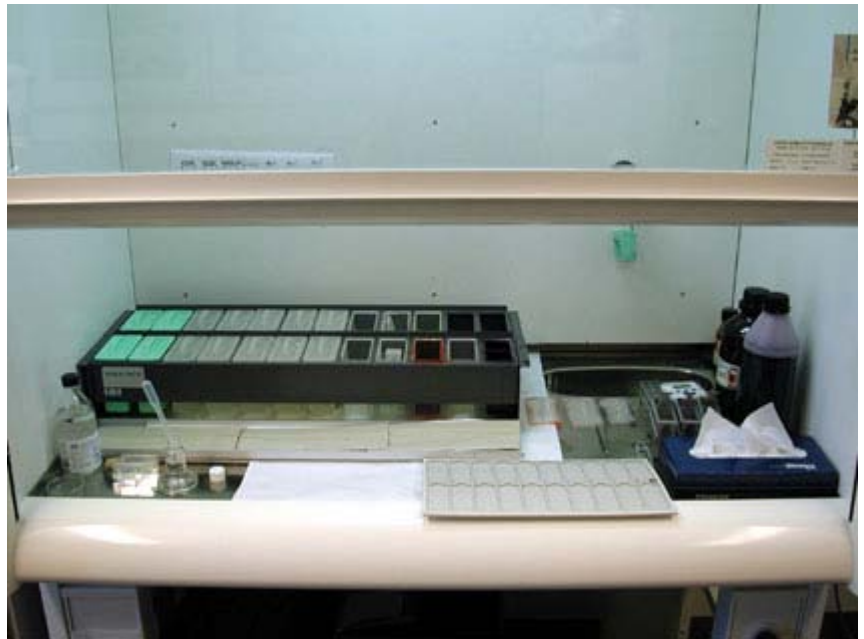
Man kan velge å la fargeprosessen gå over to dager. Det var det vi gjorde.

Dag 1

Deparaffinering /hydrering

Snittene settes i en beholder som flyttes fra den ene løsningen etter den andre etter gitte tidsintervaller.

Snittene kommer støpt i parafin. De er altså i fett. For at man skal kunne farge dem, må man gjøre dem vandige. Derfor går man fra Xylen via 100 % etanol til 96 % etanol. Deretter utføres:



Quenching

Quenchingen består av 3 % vannstoff (hydrogenperoksid,

H_2O_2) i metanol. Hensikten med dette er å dempe endogen peroksidase i vevet.

Peroksidaser er enzymer som kan finnes naturlig i vevet, de katalyserer oksidering av forskjellige substrater. Ved farging av vevet tilsetter vi senere horseradish peroxidase som er med å gi utfelling av et brunt reaksjonsprodukt som farger vevet. Dersom det er andre peroksidaser i vevet, kan de også gi utfelling av farge der det ikke er antigen. Peroksidasene kan derfor potensielt gi forstyrrende bakgrunnsfarge, en uspesifikk farging som ikke har noe med antigenet å gjøre. Snittene behandles i 30 minutter og skylles i destillert vann en gang, så i PBS i 2x5minutter.

Epitop demaskering

Dette kan enten gjøres enzymatisk (PIER), eller ved varmebehandling i trykkoker, (HIER). Dette gjør man for å "åpne" vevet fra fikseringen. Fikseringen endrer den tredimensjonale strukturen til proteinet, det blir krøllet sammen. På grunn av det, kan det være at den epitopen vi ønsker å binde antistoffet til, er utilgjengelig.

Dersom det er tilfellet, kan vi ende opp med falske negative resultater. Noen ganger må PIER eller HIER brukes, for at antistoffet skal komme til.

Følgende enzymer ble brukt u/HIER

- Proteinase K 20µg/ml
- Pepsin 8µg/ml

Noen snitt forble ubehandlet (ikke behandlet verken med PIER eller HIER)

HIER ble utført med disse bufferne:

- CCA pH7,5
- EDTA pH8
- Natriumcitrat pH6

Kontroller:

- positive CCA m/HIER og uten HIER. Tilsatt antistoff 1:500
- negative kontroller CCA og HIER. Ikke tilsatt antistoff, men IgG og PBS

Etter forbehandlingen ble snittene vasket i PBS 2x5min. Tørket forsiktig og ringet rundt med fettpenn. Dette gjøres for at ikke normalserumet og de andre stoffene vi tilsetter skal gli ut over hele objektivglasset, eller blande seg med andre løsninger på andre vevsbiter.

Normalserum appliseres

Normal Geit appliseres på alle snitt virker i 30 minutter ved romtemperatur.

Normalserum kan velges av hvilket som helst dyr, bortsett fra det dyret som antistoffet kommer fra. Man velger gjerne dyr som kan produsere store mengder antistoff, som geit, esel, hest og så videre. Normalserum brukes til å blokkere uspesifikk binding av det sekundære antistoffet til Fc-reseptorer i vevet. Det skal matche kildedyret til det sekundære antistoffet.

(Følg nå punktene i figur 3)

1) Primærantistoff appliseres

Vi varierte med ulike konsentrasjoner av antistoffet 1:100, 1:200 og 1:1000, innen alle de nedenfor nevnte gruppene av forbehandling. De eneste snittene som ikke fikk antistoff, var de negative kontrollene.

Snittene ble så lagt i en lukket boks, med mettet luftfuktighet slik at ikke snittene *skulle tørke ut og plassert i kjøleskap ca 4 °C over natten.*

Dag 2

Hentet snittene frem fra kjøleskapet. Banket av dem og satte dem i et kar med PBS. Skyllet så 2x5 minutter.

2) Sekundærantistoff appliseres

Sekundærantistoff av typen geit α kanin som fikk virke i 30 minutter ved romtemperatur. Det dannes i løpet av denne tiden binding mellom det sekundære og det primære antistoff.

Skyllet så 2x5 min i PBS.

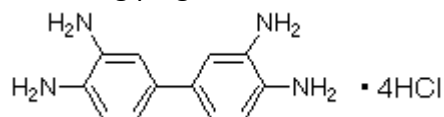
3) ABC^{hrp}

Påførte ABC^{hrp} (avidin biotin kompleks) som fikk virke i 60 min ved romtemperatur. ABC^{hrp} er Avidin og biotinyleret horse radish peroksidase i kompleks. Dette er store molekyler som binder seg til det sekundære antistoffet. Hvert molekyl har flere bindingssteder som senere reagerer med tilsatt DAB slik at vi får en utfelling av fargemolekyler. På denne måte forsterkes signalet fra p75^{NTR}.

4) DAB og 1 ‰ H₂O₂

Tilsetting av DAB, eller 3,3'-diaminobenzidin tetrahydroklorid som er det fulle navnet, er neste steg. For å aktivere DAB tilsettes 1 ‰ H₂O₂ like før bruk. Vannstoffet har kort virkning i DAB, da det "brenner ut" etter ca 20 minutter i en oksidasjonsreaksjon med DAB. H₂O₂ tilsettes derfor like før bruk. Den ferdige blandingen appliseres i 7 minutter, og det er viktig at det ikke ligger på lenger enn det, da det kan gi veldig mørk farging. Grunnen til at vi får farge, er at HRP fra ABC reagerer med DAB i en oksidasjonsreaksjon som er mulig på grunn av H₂O₂. Denne reaksjonen gir utfelling av et

reaksjonsprodukt som er brunt. Nå felles det ut mange fargemolekyler som bindes i vevet



akkurat over det stedet vi har antigenet vårt. DAB er karsinogent, så man skal bruke det med forsiktighet, og alltid ha hansker på. DAB ufarliggjøres ved reaksjon med klor, alt utstyr som har kommet i kontakt med DAB, rengjøres derfor først i klorbad.

Snittene skylles nøye i destillert vann etter fargingen, for å få bort all ikke-bundet DAB.

Kontrastfarging med hematoksylin

Hematoksylinet siles gjennom et filterpapir for å få bort eventuelle krystaller i væsken. Snittene settes nedi beholderen og farges i ca 5 sekunder, før de skylles godt i en stor bøtte med springvann, så i destillert vann og til slutt "blånes" fargen i 1 minutt skylning i PBS.

Dehydrering

Snittene går gjennom løsninger på 70 %, 96 %, 100 % etanol og til slutt Xylen etter gitte tidsintervaller. Både punkt 5 og 6 foregår i et lukket skap med avtrekk for damp.

Montering

Snittene får et dekkglass over som beskytter vevsbitene ved senere bruk og lagring. Dekkglasset limes på med et xylenbasert lim (Histokit) og må ligge i avtrekk en stund for fordampning av xylenet.

Takk:

Jeg vil gjerne takke Magne Bryne for muligheten til å være på IOB og lære om immunhistokjemi, samt for oppfølging og veiledning av oppgaven.

Ingvild J. Brusevold og Tine M. Søland for all tid de har satt av til å hjelpe meg å lære metoden, finne materiale, lære meg å tolke funn, og finne sikre kilder, samt mye veiledning med oppgaven.

Olav Shcreurs for hjelp på laboratoriet

Reference List

- (1) Petersen PE. Oral cancer prevention and control - The approach of the World Health Organization. *Oral Oncol* 2004 Apr;45(4-5):454-60.
- (2) Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol* 2004 Apr;45(4-5):340-50.
- (3) Warnakulasuriya S, Trivedy C, Peters TJ. Areca nut use: an independent risk factor for oral cancer. *BMJ* 2002 Apr 6;324(7341):799-800.
- (4) Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol* 2004 Apr;45(4-5):301-8.
- (5) Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2004 Apr;45(4-5):309-16.
- (6) Soland TM, Brusevold IJ, Koppang HS, Schenck K, Bryne M. Nerve growth factor receptor (p75NTR) and pattern of invasion predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2008 Jul 18;53(1):62-72.

- (7) Odd O.Aalen, Arnaldo Frigessi. Statistiske metoder i medisin og helsefag . Gyldendal akademisk; 2006.